

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAMILA SOUZA COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À
MÚSICA E AO RUÍDO BRANCO EM UM MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO.**

CURITIBA

2017

KAMILA SOUZA COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À
MÚSICA E AO RUÍDO BRANCO EM UM MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO.**

Monografia apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel, Curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Prof. Bruno Jacson Martynhak

CURITIBA

2017

TERMO DE APROVAÇÃO

KAMILA SOUZA COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À
MÚSICA E AO RUÍDO BRANCO EM UM MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO.**

Monografia apresentada como requisito parcial à para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Jacson Martynhak
Departamento de Fisiologia, UFPR

Banca avaliadora: Prof^a Dra Cristina Stern
Departamento de Farmacologia, UFPR

Prof^a Dra. Claudia Maria Sallai Tanhoffer
Departamento de Fisiologia, UFPR

Curitiba, 21 de Dezembro de 2017.

RESUMO

A depressão é o transtorno de humor mais recorrente na população, sendo que o número de pacientes diagnosticados cresce anualmente. Nesse contexto, terapias não farmacológicas têm sido empregadas de forma complementar aos tratamentos convencionais, como forma de melhorar a autoestima, convívio social e conforto dos pacientes, sendo a terapia musical um dos destaques nessa modalidade. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da exposição à música e ao ruído branco em modelos animais de depressão, para avaliar seus efeitos antidepressivos. Para tanto, a imobilização crônica em camundongos foi utilizada como modelo de depressão. Como tratamento, os animais foram expostos durante 21 dias a música de Mozart K.448 para dois pianos ou ao ruído branco, sendo que o comportamento dos animais foi avaliado pelos testes de preferência por sacarose, campo aberto, *Splash Test* e suspensão pela cauda. O *Splash Test* evidenciou um efeito ansiolítico e antidepressivo do tratamento com música, já o teste de suspensão pela cauda apresentou um efeito paradoxal em relação ao protocolo de estresse, sendo que os animais submetidos a imobilização crônica e tratados com ruído branco tiveram melhor desempenho durante o teste. Ainda, no teste de preferência por sacarose, todos os grupos avaliados apresentaram uma redução da preferência significativa em relação à semana basal, e nenhum dos grupos teve aumento significativo da preferência por sacarose ao longo das semanas, indicando um estado anedônico generalizado entre os grupos. Em conjunto, esses dados indicam que um fator externo ao experimento atuou sobre os grupos, alterando o comportamento dos animais e enviesando as análises. Sugere-se que estudos futuros trabalhem de forma que possam controlar todos os fatores ambientais e, ainda, sugere-se alterações no período e duração do protocolo de tratamento.

Palavras chave: depressão, tratamentos não-farmacológicos, música.

ABSTRACT

Depression is the main mood disorder among world wild population, and the number of patients is increasing every year. In this context, non-pharmacological therapies are applied as complementary therapy to improve patient's self-esteem, wellbeing and social skills. In this scenario, music therapy is one of the most popular non-pharmacological treatment. The present research aimed to investigate the effects of music and white noise on animal models of depression. For this purpose, restraint stress was used in mice to access a depressed-like behavior. Mozart K.448 and white noise were applied for 21 days as therapy protocol. Sucrose preference test, open field, splash test and tail suspension test were used to evaluate changes in animal behavior. The Splash Test showed an anxiolytic and antidepressant effect of music treatment, but the tail suspension test showed a paradoxical effect concerning the stress protocol: animals subjected to forced immobilization and treated with white noise had better performance during the test. Besides, in the sucrose preference test all evaluated groups showed a significant preference reduction relative to baseline, and none of the groups had significant increase in preference for sucrose over the weeks, indicating a generalized anhedonic state between the groups. Together, these data indicate that a external factor to the experiment may have performed on the groups, changing the behavior of animals and provoking analysis bias. It is suggested that future studies work in an environment where they can control all the environmental factors, preventing an external bias. We also suggest changes in the period and duration of the treatment protocol, so they can be more effective.

Key-words: depression, non-farmacological treatment, music.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-CRONOGRAMA EXPERIMENTAL.....	15
FIGURA 2-CURVA DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE	19
FIGURA 3-RESULTADO TESTE DE CAMPO ABERTO	20
FIGURA 4-RESULTADO DO <i>SPLASH TEST</i>	21
FIGURA 5-RESULTADO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 JUSTIFICATIVA	9
1.2 OBJETIVO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 ANIMAIS	12
3.2 PROTOCOLO DE ESTRESSE	12
3.3 PROTOCOLO DE TRATAMENTO	13
3.4 PREFERÊNCIA POR SACAROSE	13
3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS E CRONOGRAMA	14
3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS	15
3.6.1 Campo aberto	15
3.6.2 Splash Test	16
3.6.3 Suspensão pela cauda	17
3.6.4 Análises estatísticas	18
4. RESULTADOS	19
4.1 PREFERÊNCIA POR SACAROSE	19
4.2 CAMPO ABERTO	20
4.3 SPLAH TEST	21
4.4 SUSPENSÃO PELA CAUDA	21
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde estima que 4,4% da população mundial, cerca de 322 milhões de pessoas, sofre de depressão. Tal transtorno entre outros fatores, é associado a alterações na regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), à concentração de cortisol e atrofia de regiões como o hipocampo (especialmente células da região CA3) e o córtex pré-frontal (Magariños, Verdugo e McEwen, 1997; BREMNER et al., 2000; LINDAUER et al., 2006; ORTÍ et al., 2017). Essas alterações, por sua vez, estão relacionadas a resposta não-adaptativas ao estresse crônico.

A resposta fisiológica ao estresse é coordenada pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), em grande parte influenciado pela liberação de glicocorticóides (ORTÍ et al., 2017). Nesse aspecto, o hipocampo é uma importante estrutura reguladora do eixo HPA, exercendo influência inibitória na amígdala e no hipotálamo (Nestler et al., 2002) e, sendo sensível a variação dos níveis de cortisol, com grande densidade de receptores para glicocorticóides, funciona como um mecanismo de feedback do eixo HPA, exercendo grande influência sobre as respostas ao estresse (Lupien 1998, Gamaro 1999).

No entanto, o estresse crônico pode tornar o eixo hiper-reativo, tirando o indivíduo da homeostase e conseqüentemente levando ao desenvolvimento de patologias, em especial, a depressão. Modelos animais de depressão evidenciaram que o estresse crônico está relacionado com atrofia hipocampal e diminuição da concentração da neurotrofina BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Lupien 1998, Frodl 2006).

Em 2015, a depressão maior foi apontada como a maior causa de invalidez no mundo, representando, sozinha, 7,5% dos casos (World Health Organization; 2017). Dado a prevalência e a gravidade da depressão, investimentos têm sido feitos para a pesquisa de novos fármacos que sejam capazes de amenizar os sintomas da depressão e prevenir a recorrência de crises depressivas. Porém, a eficácia do tratamento farmacológico é baixa, com um terço dos pacientes não apresentando

resposta (50% de melhora) após múltiplos tratamentos. Além disso, os efeitos adversos são um grande fator que diminui a aderência ao tratamento (CUNHA; GANDINI 2009). Assim, terapias não-farmacológicas têm sido utilizadas como adjuvantes no tratamento da depressão como forma de potencializar o bem-estar do paciente.

Na clínica humana, a terapia musical está entre os principais tratamentos não farmacológicos, principalmente no Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas (HSU et al., 2017). Nos pacientes, ela pode diminuir respostas agudas ao estresse e diminuir a ansiedade, melhorando a qualidade de vida dos pacientes, seu convívio social e a capacidade de expressão (ORTÍ et. al 2017).

1.1 JUSTIFICATIVA

Dado o crescente interesse clínico em terapias não-farmacológicas, em especial a terapia musical, o presente trabalho propõe estudar o efeito da música no comportamento tipo-depressivo em camundongos, atuando como um tratamento adjuvante na depressão.

1.2 OBJETIVO

Avaliar o efeito da exposição repetida à música sobre o comportamento tipo-depressivo de camundongos submetidos ao modelo de depressão de estresse por restrição forçada de mobilidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A música faz parte da história evolutiva da humanidade e é utilizada nas comunidades para fortalecer traços culturais, para recreação, além de despertar e modular emoções nos indivíduos (FUKUI; TOYOSHIMA, 2008). Hoje, sabe-se que, além do fator cultural e afetivo, ela pode interferir na fisiologia de órgãos e sistemas, e por isso a terapia musical tem ganhado força como objeto de estudos, principalmente na última década (FANCOURT; OCKELFORD; BELAI, 2014;).

Pesquisadores buscam avaliar principalmente os efeitos da música sobre o desenvolvimento cognitivo, memória espacial, frequência cardíaca, pressão arterial, alívio da dor, no estresse e ansiedade (FANCOURT; OCKELFORD; BELAI, 2014; ALWORTH et al., 2013). Em relação às patologias do sistema nervoso central, a terapia musical tem sido aplicada como adjuvante especialmente na Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e depressão (MATRONE; BRATTICO, 2015). Esses pacientes, após o tratamento com terapia musical relataram melhora na auto-estima, memória, na ansiedade e em quadros depressivos (JIANG et al., 2013; GUTIÉRREZ; CAMARENA, 2015; HSU et al., 2017).

Nos pacientes depressivos, a terapia musical, utilizada como complementar ao tratamento padrão, foi capaz de potencializar a redução dos sintomas depressivos e ansiosos tanto em pacientes adultos (CHOI; LEE; LIM, 2008; ERKKILA et al., 2011; LU et al., 2013) quanto em pacientes idosos (CHAN; CHAN; MOK, 2010; CHAN et al., 2011) e jovem-adultos (ESFANDIARI; MANSOURI, 2014). A terapia musical apresentou efeito benéfico não apenas nos pacientes, mas também nos cuidadores (SÄRKÄMÖ et al., 2013), reduzindo o estresse e melhorando o bem-estar auto relatado desses profissionais. Nesses estudos, os sintomas foram avaliados pela aplicação de diversos questionários, como o *Beck's Depression Inventory*, *State and Trait Anxiety Inventory* e *Geriatric Depression Score*.

Com relação ao protocolo de tratamento, metade das pesquisas clínicas com efeito significativo de melhora dos pacientes utilizou música clássica, principalmente dos compositores Mozart, Beethoven e Bach (LEUBNER; HINTERBERGER, 2017). No

entanto, outros compositores e estilos musicais diferentes foram aplicados durante o tratamento com resultados semelhantes (ESFANDIARI; MANSOURI, 2014; ORTÍ et al., 2017).

Em modelos animais, diversos protocolos de exposição à música têm evidenciado alterações no comportamento de roedores, principalmente relacionados a memória espacial e comportamentos tipo-agressivos (ANGELUCCI et al., 2007; ALWORTH et al., 2013). Tais protocolos, apesar da diversidade de compositores, utilizam músicas que apresentam ritmicidade semelhante, o que enfatiza os achados de Xing et al. (2016), de que a ritmicidade é mais importante do que a altura do som como fator modulatório na terapia musical.

Simultaneamente, alterações fisiológicas importantes foram relatadas, principalmente relacionadas à expressão de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro), NGF (Fator de crescimento nervoso) e neurogênese hipocampal. Roedores expostos ao tratamento com música apresentaram significativo aumento na expressão de BDNF no hipocampo, principalmente nas regiões CA3 e no giro denteado (ANGELUCCI et al., 2007; XING et al., 2016a).

Camundongos *knock-in* para o gene BDNF^{Met} (relacionado à suscetibilidade para doenças neuropsiquiátricas em humanos) expostos à música também apresentaram significativo aumento na concentração de mRNA codificante para BDNF e TrkB (receptor do BDNF) no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala em relação aqueles expostos ao ruído branco, acompanhado pela redução de comportamento tipo ansioso (LI et al., 2010).

Visto que modelos animais de depressão levam à redução dos níveis hipocampais de BDNF, sendo esta redução revertida por tratamento crônico com antidepressivos, e que a exposição crônica à música leva ao aumento de BDNF, levantamos a hipótese que a exposição crônica à música também poderia levar a efeitos antidepressivos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 50 camundongos Swiss machos fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos no próprio biotério, com temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo 12 horas claro/12 horas escuro. Durante todo o experimento os animais foram mantidos isolados em suas respectivas caixas-moradia. Água e ração foram normalmente disponibilizadas durante todas as fases do experimento.

O estudo foi realizado de acordo com as recomendações da Universidade Federal do Paraná e sob aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, protocolo 1059.

3.2 PROTOCOLO DE ESTRESSE

O protocolo de estresse adotado neste trabalho foi o modelo de restrição forçada de mobilidade crônica. Tal modelo, daqui para frente referido como imobilização crônica, foi escolhido por já ser bem estabelecido e validado na literatura, além de não causar dor ao animal (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; CAMPOS et al., 2013).

O protocolo foi realizado de acordo com testes pilotos realizado em nosso laboratório (dados não publicados):

- **Materiais:** o aparato utilizado para restringir a movimentação dos animais foi um tubo Falcon, previamente perfurados para permitir a respiração dos animais.
- **Tempo de protocolo:** os animais foram submetidos a 2 horas de imobilização por dia, durante 28 dias consecutivos.
- **Período de recuperação:** após o fim do protocolo de imobilização, os animais eram deixados intocados por trinta minutos em suas respectivas caixas-moradia antes do início da exposição à música ou ruído branco.

3.3 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Dois tratamentos foram utilizados durante o experimento: música (sonata de Mozart K.448 para dois pianos) e ruído branco. Os animais foram expostos diariamente (durante 21 dias consecutivos), à uma hora de Mozart K.448 ou ruído branco a 65 dB, em seus respectivos grupos.

Música e ruído branco foram reproduzidos com auxílio de aparelhos de som posicionados a um metro da caixa moradia dos animais, logo após o período de recuperação do protocolo de imobilização crônica.

3.4 PREFERÊNCIA POR SACAROSE

A anedonia, definida como redução na capacidade de sentir prazer (GORWOOD, 2008) é um dos principais critérios no DSM-V para se diagnosticar um paciente com depressão maior.

O sintoma, recorrente na clínica, pode ser evocado em modelos animais de estresse e serve como parâmetro de análise em estudos pré-clínicos (STREKALOVA et al., 2011).

Neste trabalho, a anedonia foi medida a partir do teste de preferência por sacarose, como descrito por Strekalova et al. (2004), com modificações.

- **Habituação:** antes do início dos testes, foi feita uma habituação com solução de sacarose 2%, para evitar o viés de rejeição dos animais à uma substância desconhecida durante o teste (STREKALOVA; STEINBUSCH, 2010). No primeiro dia de habituação, foi retirada a garrafa de água pura dos animais e apresentada a garrafa com solução de sacarose 2%. No segundo dia de habituação, foi retirada a garrafa de água com a solução de sacarose e recolocada a garrafa com água pura. No terceiro dia de habituação, tanto a garrafa com água pura e a garrafa com solução 2% de sacarose foram apresentadas aos animais e

deixadas disponíveis por 48 horas. No quinto dia de habituação, todas as garrafas foram novamente retiradas e apenas a garrafa com água pura foi reapresentada aos animais.

- **Teste de Preferência por Sacarose:** Toda semana os animais foram submetidos aos testes de preferência por sacarose como descrito a seguir: garrafas de água pura e garrafas de água com solução de sacarose 2% previamente pesadas eram oferecidas aos animais e deixadas disponíveis por 24 horas. Ao final das 24 horas, as garrafas eram retiradas e novamente pesadas. A preferência por sacarose (PS) foi medida como:

$$PS = \text{consumo solução de sacarose} \div \text{consumo total de líquido} \times 100$$

O primeiro dia de teste foi realizado para estabelecer o nível basal de preferência por sacarose. Animais com preferência basal menor que 70% foram excluídos do experimento.

3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS E CRONOGRAMA

Após obtenção dos dados da preferência por sacarose, os animais foram randomicamente distribuídos em quatro grupos:

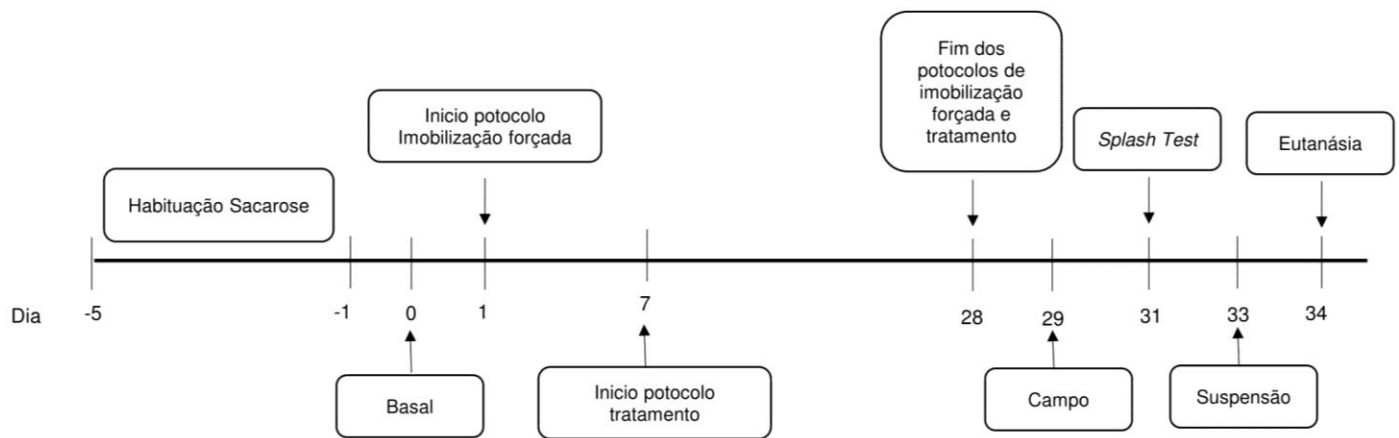
QUADRO 1-DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Estresse	Tratamento	Número amostral
Controle	Ruido branco	9
Imobilização crônica	Ruído branco	10
Controle	Mozart K.448	10
Imobilização crônica	Mozart K.448	11

Fonte: elaborado pelos autores.

Como explicado anteriormente, animais com preferência basal por sacarose inferiores a 70% foram excluídos do experimento, e não entraram na contagem dos grupos. Assim, oito animais foram excluídos nessa fase do experimento. Ainda, durante as fases seguintes, dois animais foram retirados antes do fim dos experimentos, pois ficaram doentes. Assim, para evitar sofrimento desnecessário aos animais e não provocar um viés na análise optou-se por eutanasia-los.

FIGURA 1-CRONOGRAMA EXPERIMENTAL



3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

Além do teste de preferência por sacarose, ao final do protocolo de tratamento dos animais, foram realizados três testes comportamentais, descritos a seguir:

3.6.1 Campo aberto

O campo aberto, desenvolvido na década de 30, consiste em colocar o animal em uma arena vazia (geralmente quadrada ou circular), com paredes altas o suficiente para não deixar o animal escapar. É um teste comportamental que busca avaliar prioritariamente a atividade locomotora dos animais. No entanto, o teste pode avaliar ainda aspectos emocionais tipo ansiosos (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). A

avaliação do tipo ansioso é baseado na premissa de que os animais naturalmente passam mais tempo perto das paredes do campo aberto, evitando o centro da arena (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009).

No teste foi utilizada uma arena circular (com 60 centímetros de diâmetro), de plástico. Após uma hora de aclimação na sala de experimentos, cada animal, isoladamente, foi posicionado no centro da arena e deixado para explorar livremente a arena por cinco minutos. A arena foi limpa com álcool 10% entre cada animal, para evitar que o cheiro interferisse no teste seguinte.

A análise foi feita com o auxílio do software Smart Junior®, e os parâmetros obtidos foram: distância total percorrida, tempo de permanência no centro da arena, tempo de permanência na periferia e número de entradas no centro.

3.6.2 Splash Test

O *grooming* é um comportamento natural e instintivo de roedores que consiste na limpeza da pelagem. Além da função de higiene, o *grooming* também está relacionado com a termo regulação, interação social e diminuição do estresse (SMOLINSKY et al., 2009), e representa de 30% a 50% do comportamento observado durante a fase ativa desses animais (GALLAGHER et al., 2006).

Por se tratar de um comportamento bem estabelecido, o *grooming* pode ser utilizado como parâmetro para avaliar estresse e anedonia (SMOLINSKY et al., 2009). Modelos como o UCMS (Unpredictable Chronic Mild Stress) diminuem o tempo de *grooming*, sendo considerado um paralelo com o estado apático avaliado na clínica humana em pacientes depressivos (ISINGRINI et al., 2010).

Neste estudo, para avaliar o *grooming*, foi utilizado o *Splash Test*, como descrito por Yalcin, Belzung e Surget (2008): após uma hora de aclimação na sala de experimentos, uma solução de sacarose 10% foi aplicada no dorso dos animais, na própria caixa moradia, com o auxílio de um spray. Tal solução foi aplicada para

estimular o *grooming*. Logo após a aplicação, o comportamento do animal foi filmado por 5 minutos para análise posterior.

A análise foi feita com o auxílio do software X-plo-Rat®, e os parâmetros analisados foram: a latência para início do *grooming* e o tempo total deste comportamento. A contabilização do tempo de *grooming* só foi iniciada a partir do momento que o animal apresentava o mesmo comportamento por pelo menos dois segundos.

3.6.3 Suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda, proposto por Steru e colaboradores (1985), se baseia na premissa de que animais, ao enfrentarem uma situação estressante inescapável, vão apresentar comportamentos de desistência de escape (desamparo aprendido), sendo revertida pelo pré-tratamento com antidepressivos.

No teste em questão, o desamparo é evidenciado pela imobilidade postural do animal. Cryan, Mombereau e Vassout (2005) consideram que tal imobilidade postural pode ser considerada análoga ao quadro clínico depressivo em seres humanos, já que esses podem apresentar como sintomas sentimentos de desânimo e impotência.

O teste foi realizado como descrito por Costa (2012): após uma hora de aclimação na sala de experimentos, cada animal foi suspenso pelo rabo (aproximadamente a $\frac{3}{4}$ da base) na bancada de experimentos com o auxílio de fita adesiva, e de forma a ficar com a porção ventral voltada para a câmera. Os testes tiveram duração de seis minutos e foram gravados para análise posterior.

A análise foi feita com o auxílio do software X-plo-Rat®, e os parâmetros contabilizados foram: latência para início da imobilidade postural e o tempo total deste comportamento. Assim como no *Splash Test*, a contabilização do tempo de imobilidade postural só foi iniciada a partir do momento que o animal apresentava o mesmo comportamento por pelo menos dois segundos.

3.6.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA®. Os testes comportamentais foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias, enquanto a preferência por sacarose foi avaliada pela ANOVA de medidas repetidas. Nos casos pertinentes, a análise post hoc de Newman–Keuls foi aplicada.

4. RESULTADOS

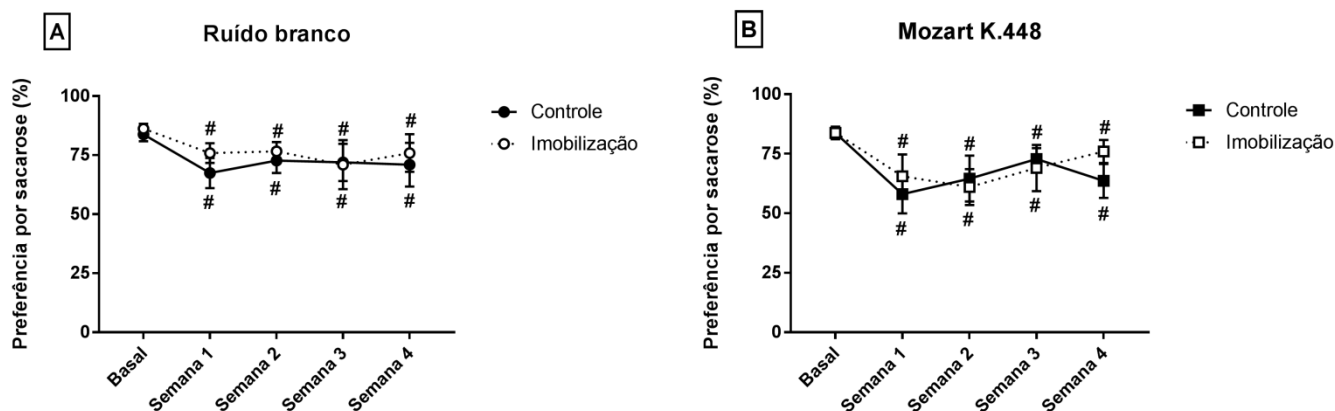
4.1 PREFERÊNCIA POR SACAROSE

A ANOVA de medidas repetidas detectou apenas efeito da semana ($F(4, 144)=4,26$; $p=,002$) sobre a preferência por sacarose, sendo que todos os grupos tiveram redução de preferência na semana 1 em relação ao basal. Nas semanas seguintes a preferência por sacarose manteve-se baixa em todos os grupos, sendo que as diferenças entre as semanas 1, 2, 3 e 4 não foram significativas.

Em conjunto, tais dados indicam que um fator não vinculado ao experimento pode ter influenciado no comportamento dos animais, sendo mais expressivo do que os possíveis efeitos causados pelos protocolos de estresse e tratamento.

Entre esses fatores, podemos citar o isolamento dos animais e o transporte diário do biotério à sala de experimentação. A falta de interação social, troca diária do ambiente familiar, barulho, vibração, e oscilação de temperatura durante o transporte podem estar relacionados à queda da preferência por sacarose ao longo das semanas (ANDRADE, 2002).

FIGURA 2-CURVA DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE



Teste de preferência por sacarose: Dados expressos em relação ao erro padrão. **A**-Curva de preferência por sacarose dos grupos controle e imobilização crônica expostos ao ruído branco. Efeito da semana foi significativo ($p < 0,05$). **B**- Curva de preferência por sacarose dos grupos controle e imobilização crônica expostos a música. # $p < 0,05$ em relação ao basal (para todos os grupos).

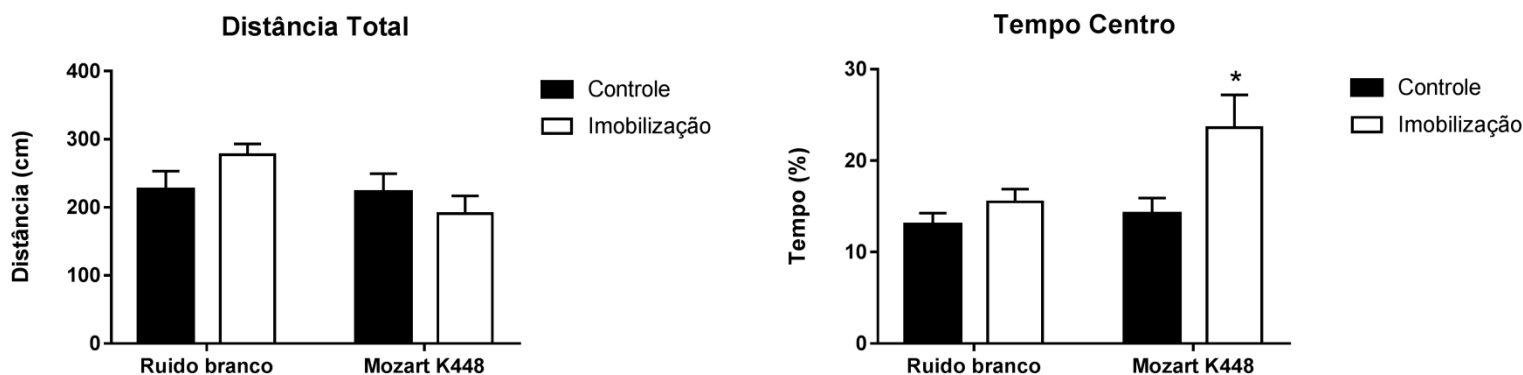
4.2 CAMPO ABERTO

A análise de duas vias não detectou efeito significativo do estresse ($F(1, 36)=0,15$; $p=0,69$), tratamento ($F(1, 36)=3,32$; $p=0,07$) ou da interação dos dois fatores ($F(1, 36)=2,85$; $p=0,09$) sobre a mobilidade dos animais. Ainda assim, o tratamento aponta uma tendência significativa, sendo que os grupos submetidos ao ruído branco percorreram uma distância maior em relação àqueles submetidos ao Mozart K448.

Já em relação ao tempo de permanência no centro da arena, foi detectado efeito do estresse ($F(1, 36)=6,44$; $p=0,01$), sendo que os grupos que passaram pela imobilização crônica passaram mais tempo no centro da arena. Esse resultado indica um efeito contraditório, pois o protocolo de estresse teve um efeito ansiolítico.

Ainda nesse parâmetro, o tratamento teve tendência significativa ($F(1, 36)=3,9207$; $p=0,055$), sendo que a música apresentou efeito ansiolítico. Não houve efeito da interação entre tratamento e estresse.

FIGURA 3-RESULTADO TESTE DE CAMPO ABERTO



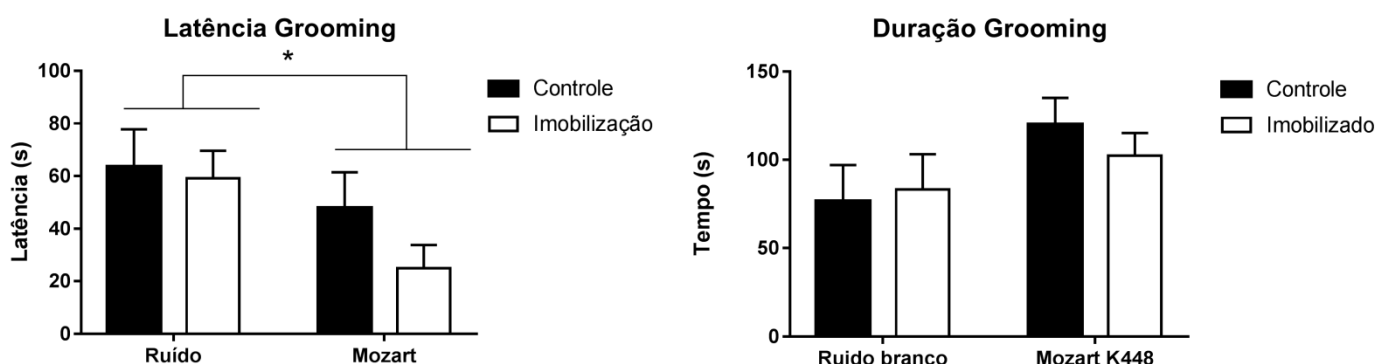
Teste de campo aberto: Dados expressos em relação ao erro padrão. **A-** Distância total percorrida durante o teste. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). **B-** Tempo total de permanência no centro da arena. * $p<0,05$ em relação ao grupo Mozart 448/Controle.

4.3 SPLAH TEST

A ANOVA de duas vias detectou efeito apenas do tratamento ($F(1, 36)=4,52$; $p=0,040$) sobre a latência para o início do *grooming*, sendo que os grupos submetidos ao ruído branco tiveram maior latência em relação àqueles submetidos ao Mozart K448.

Já para a duração do *grooming*, não houve efeito significativo do estresse ($F1, 36=0,10$; $p= 0,74$), do tratamento ($F 1, 36=3,38$; $p=0,07$) ou da interação desses parâmetros ($F(1, 36)= 0,50$; $p=0,48$). No entanto, o tratamento teve uma tendência significativa, sendo que os grupos expostos ao Mozart K448 passaram mais tempo em *grooming* do que aqueles expostos ao ruído branco.

FIGURA 4-RESULTADO DO SPLASH TEST



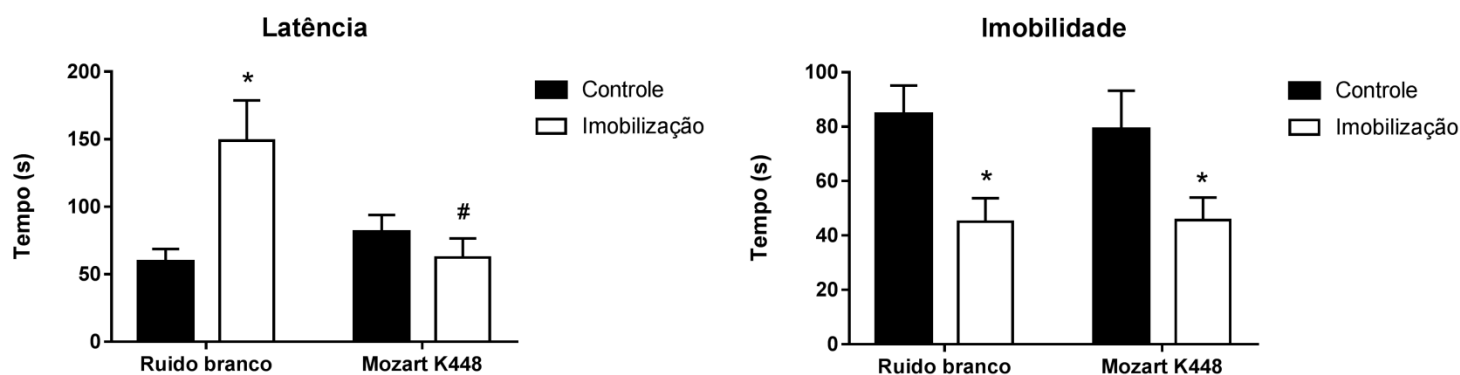
Splash Test: Dados expressos em relação ao erro padrão. **A**-Latência para início do *grooming*. * $p<0,05$ (fator tratamento) **B**- Tempo total de *grooming*. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$).

4.4 SUSPENSÃO PELA CAUDA

A ANOVA de duas vias detectou efeito da interação do tratamento e do estresse ($F(1, 36)=8,5783$, $p=0,005$) sobre a latência para início da imobilidade, mas não dos parâmetros isolados (tratamento - $F 1,36 = 3,02$; $p = 0,090$ e estresse- $F1,36 = 3,65$; $p = 0,064$). A análise post hoc evidenciou que o grupo submetido a imobilização crônica e ao ruído branco apresentou maior latência para imobilização em comparação com os outros três grupos ($p < 0,05$).

Já para o tempo total de imobilidade, houve efeito apenas do estresse ($F(1, 36)=11,53$, $p=0,001$), sendo que os grupos submetidos a imobilização crônica tiveram menor tempo de imobilidade durante o teste, em relação aos grupos controles. A análise post hoc indicou que os grupos controle passaram mais tempo imóveis durante o teste, em relação aos demais grupos. Em conjunto, estes dados indicam um paradoxal efeito tipo antidepressivo do estresse de imobilização crônica.

FIGURA 5-RESULTADO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA



Suspensão pela cauda: Dados expressos em relação ao erro padrão.. **A**-Latência para imobilidade. **B**- Tempo total imobilidade. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle do mesmo tratamento. # $p<0,05$ em relação ao grupo imobilização/ruído branco.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O primeiro passo para as análises foi verificar se o protocolo de estresse ou o tratamento poderiam afetar a mobilidade dos animais. Para tanto, foi utilizado o teste de campo aberto. O teste não evidenciou diferença estatística entre os grupos, sustentando que nem a imobilização, nem a música ou o ruído branco afetaram a capacidade locomotora dos animais (LI et al., 2010).

Em relação ao tratamento, houve um efeito ansiolítico no grupo exposto à música e submetido ao estresse crônico de imobilização evidenciado pelo maior tempo de permanência no centro da arena no teste de campo aberto, indicando um resultado contraditório em relação ao protocolo de estresse, já que se esperava que os animais estressados passassem menos tempo no centro.

O *Splash Test* evidenciou efeito da exposição à música na diminuição da latência e aumentou o tempo de expressão do comportamento de *grooming*. Esses dois parâmetros suportam que o tratamento com música foi eficaz para melhorar o autocuidado dos animais, em comparação com aqueles expostos ao ruído branco.

Em contraste, no teste de suspensão pela cauda, o grupo submetido ao estresse e exposto ao ruído branco apresentou uma maior latência para a imobilidade, efeito este que foi revertido pela exposição à música. Portanto, houve um efeito paradoxal tipo-antidepressivo no grupo submetido ao estresse que foi prevenido pela música. Com relação ao tempo total de imobilidade, ambos os grupos submetidos ao estresse apresentaram menor imobilidade, indicando novamente um efeito tipo-antidepressivo induzido pelo estresse, que não foi influenciado pela música.

No entanto, ao analisar a curva de preferência por sacarose, podemos inferir que possivelmente um fator externo ao experimento influenciou de forma acentuada o comportamento dos animais, enviesando as análises. Nesse caso, tal fator poderia explicar os resultados contraditórios encontrados neste estudo.

Ainda, o estudo apresentou algumas limitações que podem ter influenciado nos resultados: o protocolo de tratamento, que na literatura varia entre 6-12 horas de

exposição à música e/ou ao ruído branco nos tratamentos crônicos (ANGELUCCI et al., 2007; XING et al., 2016a), teve de ser reduzido para apenas uma hora por dia, dado limitações físicas do laboratório.

Pelo mesmo motivo, o protocolo de tratamento foi aplicado na fase clara do ciclo claro/escuro. Aplicar tal protocolo na fase inativa dos animais pode ter influenciado no ritmo circadiano dos mesmos, acentuando a anedonia dos grupos (NOVATI et al., 2008). Ainda, alterações na ritmicidade circadiana podem provocar respostas anômalas nos testes comportamentais, como a aparente redução do estado tipo-depressivo nos animais submetidos ao protocolo de estresse (SCHWEIZER; HENNIGER; SILLABER, 2009).

Assim, apesar do aparente efeito ansiolítico e de melhora no estado tipo-depressivo observado em alguns parâmetros comportamentais, os efeitos paradoxais do protocolo de imobilização crônica e do tratamento com ruído branco tendo os mesmos efeitos antidepressivos e a baixa preferência por sacarose mantida ao longo de todas as semanas do experimento não permitem avaliar de maneira adequada os efeitos do tratamento com música sobre o estado tipo-depressivo em camundongos.

Sugere-se que estudos futuros sejam realizados para reavaliar a influência da música e do ruído branco sobre o efeito tipo-depressivo em roedores. Esses estudos devem priorizar pela aplicação do tratamento na fase escura e aumentar o tempo de exposição à música, bem como controlar de forma mais precisa os fatores externos que podem influenciar o resultado das análises.

REFERÊNCIAS

- ALWORTH, Leanne C. et al. The effects of music on animal physiology, behavior and welfare. *Nature America*, [s.l.], v. 42, n. 2, p.54-61, fev. 2013.
- ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books .
- ANGELUCCI, Francesco et al. Investigating the neurobiology of music: brain-derived neurotrophic factor modulation in the hippocampus of young adult mice. *Behavioural Pharmacology*, [s.l.], v. 18, n. 5, p.491-496, fev. 2007.
- BREMNER, J. Douglas et al. Hippocampal Volume Reduction in Major Depression. *Am J Psychiatry*, [s.l.], v. 157, n. 1, p.115-117, jan. 2000.
- BUYNITSKY, Tatyana; MOSTOFISKY, David I.. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, [s.l.], v. 33, n. 7, p.1089-1098, jul. 2009. Elsevier BV.
- CAMPOS, Aline C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, [s.l.], v. 35, n. 2, p.101-111, 2013. FapUNIFESP (SciELO).
- CHAN, Moon Fai et al. Effects of music on depression in older people: a randomised controlled trial. *Journal Of Clinical Nursing*, [s.l.], v. 21, n. 5-6, p.776-783, 31 out. 2011. Wiley-Blackwell.
- CHAN, Moon Fai; CHAN, Engle Angela; MOK, Esther. Effects of music on depression and sleep quality in elderly people: A randomised controlled trial. *Complementary Therapies In Medicine*, [s.l.], v. 18, n. 3-4, p.150-159, jun. 2010. Elsevier BV.
- CHOI, Ae-na; LEE, Myeong Soo; LIM, Hyun-ja. Effects of Group Music Intervention on Depression, Anxiety, and Relationships in Psychiatric Patients: A Pilot Study. *The Journal Of Alternative And Complementary Medicine*, [s.l.], v. 14, n. 5, p.567-570, jun. 2008. Mary Ann Liebert Inc.
- COSTA, Ana Paula Ramos. *ESTUDOS DA ESTRUTURA COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS NOS TESTES DE NADO FORÇADO E DA SUSPENSÃO PELA CAUDA*. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- CRYAN, John F.; MOMBÉREAU, Cedric; VASSOUT, Annick. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, [s.l.], v. 29, n. 4-5, p.571-625, jan. 2005. Elsevier BV.
- CUNHA, Marines de Fátima; GANDINI, Rita de Cássia. Adesão e Não-Adesão ao Tratamento Farmacológico para Depressão. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, [s. L.], v. 25, n. 3, p.409-418, set. 2009.

Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

ERKKILA, J. et al. Individual music therapy for depression: randomised controlled trial. *The British Journal Of Psychiatry*, [s.l.], v. 199, n. 2, p.132-139, 7 abr. 2011. Royal College of Psychiatrists.

ESFANDIARI, Narges; MANSOURI, Somayeh. The effect of listening to light and heavy music on reducing the symptoms of depression among female students. *The Arts In Psychotherapy*, [s.l.], v. 41, n. 2, p.211-213, abr. 2014. Elsevier BV.

FANCOURT, Daisy; OCKELFORD, Adam; BELAI, Abi. The psychoneuroimmunological effects of music: A systematic review and a new model. *Brain, Behavior, And Immunity*, [s.l.], v. 36, p.15-26, fev. 2014. Elsevier BV.

FLORINDO, Iury. GROOMING COMO MARCADOR NÃO-INVASIVO DE ESTRESSE AGUDO POR CONTENÇÃO EM RATOS. 2015. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Análise do Comportamento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

FRODL, Thomas et al. Reduced hippocampal volume correlates with executive dysfunctioning in major depression. *Psychiatry Neurosci*, [s.l.], v. 5, n. 31, p.316-325, maio 2006.

FUKUI, Hajime; TOYOSHIMA, Kumiko. Music facilitate the neurogenesis, regeneration and repair of neurons. *Medical Hypotheses*, [s.l.], v. 71, n. 5, p.765-769, nov. 2008. Elsevier BV.

GALLAGHER, Ewen et al. In vitro class switching staining for flow cytometry. *Protocol Exchange*, [s.l.], p.1-17, 26 jun. 2006. Springer Nature

GAMARO, G.d. et al. Effect of repeated restraint stress on memory in different tasks. *Bchharzoinliaicn S Jtoreusrn Aanl do Fm Meemdoicrayl And Biological Research*, [s.l.], v. 1, n. 32, p.341-347, jan. 1999.

Gorwood P. Neurobiological mechanisms of anhedonia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2008;10(3):291-299.

GOULD, Todd D.; DAO, David T.; KOVACSICS, Colleen E.. The Open Field Test. Mood And Anxiety Related Phenotypes In Mice, [s.l.], p.1-20, jan. 2009. Humana Press.

GUTIÉRREZ, Enrique Octavio Flores; CAMARENA, Víctor Andrés Terán. Music therapy in generalized anxiety disorder. *The Arts In Psychotherapy*, [s.l.], v. 44, p.19-24, jul. 2015. Elsevier BV.

HSU, Ting-jung et al. Predictors of non-pharmacological intervention effect on cognitive function and behavioral and psychological symptoms of older people with dementia. *Geriatrics & Gerontology International*, [s.l.], v. 17, p.28-35, abr. 2017. Wiley-Blackwell.

ISINGRINI, Elsa et al. Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. *Plos One*, [s.l.], v. 5, n. 4, p.1-8, 28 abr. 2010. Public Library of Science (PLoS).

JIANG, Jun et al. The effects of sedative and stimulative music on stress reduction depend on music preference. *The Arts In Psychotherapy*, [s.l.], v. 40, n. 2, p.201-205, abr. 2013. Elsevier BV.

LEUBNER, Daniel; HINTERBERGER, Thilo. Reviewing the Effectiveness of Music Interventions in Treating Depression. *Frontiers In Psychology*, [s.l.], v. 8, p.1-21, 7 jul. 2017. Frontiers Media SA.

LI, Wen-jing et al. Anxiolytic effect of music exposure on BDNF^{Met/Met} transgenic mice. *Brain Research*, [s.l.], v. 1347, p.71-79, ago. 2010. Elsevier BV.

LINDAUER, Ramón J.I. et al. Cortisol, Learning, Memory, and Attention in Relation to Smaller Hippocampal Volume in Police Officers with Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry*, [s.l.], v. 59, n. 2, p.171-177, jan. 2006. Elsevier BV.

LU, Shiou-fang et al. Effects of group music intervention on psychiatric symptoms and depression in patient with schizophrenia. *Complementary Therapies In Medicine*, [s.l.], v. 21, n. 6, p.682-688, dez. 2013. Elsevier BV. LUPIEN, Sonia J. et al. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neuroscience*, [s.l.], v. 1, n. 1, p.69-73, maio 1998

Magariños AM, Verdugo JM, McEwen BS. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Science os USA* 1997;94:14002-8.

MATRONE, Carmela; BRATTICO, Elvira. The Power of Music on Alzheimer Disease and the Need to Understand the Underlying Molecular Mechanisms. *Journal Of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, [s.l.], v. 05, n. 03, p.1-20, 2015. OMICS Publishing Group.

NESTLER, Eric J. et al. Neurobiology of Depression. *Neuron*, [s. L.], v. 34, p.13-25, mar. 2002.

NOVATI, Arianna et al. Chronically Restricted Sleep Leads to Depression-Like Changes in Neurotransmitter Receptor Sensitivity and Neuroendocrine Stress Reactivity in Rats. *Sleep*, [s.l.], v. 11, n. 31, p.579-585, jul. 2008.

ORTÍ, José Enrique de La Rubia et al. Does Music Therapy Improve Anxiety and Depression in Alzheimer's Patients? *The Journal Of Alternative And Complementary Medicine*, [s.l.], p.1-4, 17 jul. 2017. Mary Ann Liebert Inc.

SÄRKÄMÖ, Teppo et al. Cognitive, Emotional, and Social Benefits of Regular Musical Activities in Early Dementia: Randomized Controlled Study. *The Gerontologist*, [s.l.], v. 54, n. 4, p.634-650, 5 set. 2013. Oxford University Press (OUP).

SCHWEIZER, Martin C.; HENNIGER, Markus S. H.; SILLABER, Inge. Chronic Mild Stress (CMS) in Mice: Of Anhedonia, 'Anomalous Anxiolysis' and Activity. **Plos One**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-11, 29 jan. 2009. Public Library of Science (PLoS).

SEIBENHENER, Michael L.; WOOTEN, Michael C.. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal Of Visualized Experiments*, [s.l.], n. 96, p.1-26, 6 fev. 2015. MyJove Corporation.

SMOLINSKY, Amanda N. et al. Analysis of Grooming Behavior and Its Utility in Studying Animal Stress, Anxiety, and Depression. *Mood And Anxiety Related Phenotypes In Mice*, [s.l.], p.21-36, 2009. Humana Press.

STERU, Lucien et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, [s.l.], v. 85, n. 3, p.367-370, out. 1985.

STREKALOVA, Tatyana et al. Stress-Induced Anhedonia in Mice is Associated with Deficits in Forced Swimming and Exploration. *Neuropsychopharmacology*, [s.l.], v. 29, n. 11, p.2007-2017, 21 jul. 2004. Springer Nature.

STREKALOVA, Tatyana et al. Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters. *Behavioral And Brain Functions*, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-18, jan. 2011. Springer Nature.

STREKALOVA, Tatyana; STEINBUSCH, Harry W.m.. Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry*, [s.l.], v. 34, n. 2, p.348-361, mar. 2010. Elsevier BV.

XING, Yingshou et al. Mozart, Mozart Rhythm and Retrograde Mozart Effects: Evidences from Behaviours and Neurobiology Bases. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-11, 21 jan. 2016. Springer Nature.

aXING, Yingshou et al. Music exposure improves spatial cognition by enhancing the BDNF level of dorsal hippocampal subregions in the developing rats. *Brain Research Bulletin*, [s.l.], v. 121, p.131-137, mar. 2016. Elsevier BV.

YALCIN, Ipek; BELZUNG, Catherine; SURGET, Alexandre. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behavioural Brain Research*, [s.l.], v. 193, n. 1, p.140-143, nov. 2008. Elsevier BV.